

Evaluación de la Persistencia en la inducción de Intercambio en las Cromátidas Hermanas (ICH) por Agentes Alquilantes

Rodríguez Reyes Regina G., Huerta Valero Caty

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Carretera México-Toluca, S/N, La Marquesa, Ocoyoacac México, México, C.P. 52750

rrr@nuclear.inin.mx; kty_hv@hotmail.com

Morales Ramírez Pedro R..

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Carretera México-Toluca, S/N, La Marquesa, Ocoyoacac México, México, C.P. 52750

pmr@nuclear.inin.mx

Resumen

Se evaluó la persistencia en la inducción de intercambio en las cromátidas hermanas (ICH) por los agentes alquilantes metil y etil-metanosulfonatos (MMS y EMS). Para ello, a grupos de ratones se les administró una dosis de estos agentes y posteriormente se analizaron los ICH's inducidos en dos periodos: temprano y tardío. Ambos agentes causaron incrementos altos de ICH en el periodo temprano y pequeños en el tardío; sin embargo, el causado tardíamente por EMS fue significativamente mayor. Esta inducción tardía de ICH por EMS posiblemente está asociada con un cambio epigenético o con la presencia de etilaductos en los enlaces fosfodiéster del ADN.

1. INTRODUCCIÓN

Los agentes alquilantes (AA) metil y etil-metanosulfonatos (MMS y EMS) son genotóxicos que transfieren radicales alquilo [1] a diferentes sitios de la molécula de ADN, dando lugar a la formación de alquil-aductos [2]. Estas lesiones entre otras, pueden generar el fenómeno genético de ICH, lo cual ha permitido considerar a éste como indicador citológico de genotoxicidad [3, 4]. Además, existen evidencias de que el ICH es la manifestación de reparación de daño mediante la recombinación homóloga en las cromátidas hermanas [5, 6].

El ICH también puede ser generado por agentes desmetilantes del ADN y en este caso, la inducción persiste de manera constante hasta por 16 ciclos de división celular (CDC) [7] lo cual sugiere que puede tener un origen epigenético.

Otros agentes, como la etil-nitrosourea (ENU) y la radiación gamma, que producen distintas lesiones en el ADN, también causan inducción persistente de ICH hasta por ocho CDC [8, 9]. Hasta ahora no hay evidencias que permitan explicar como es que la desmetilación o las lesiones al ADN pueden dar lugar a un proceso de recombinación constante por varios CDC y únicamente se han propuesto algunas hipótesis [8, 10]. Una estrategia para abordar esta interrogante podría

ser la evaluación de la persistencia en la inducción de ICH por agentes que interactúen de diferente manera con el ADN, como el MMS y el EMS.

2. OBJETIVO

Evaluar la persistencia en la inducción de ICH causada por la exposición *in vivo* a los agentes alquilantes metil y etil-metanosulfonatos.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño Experimental.

Este trabajo se llevó a cabo en células de médula ósea de ratón. Para ello, a grupos independientes de 5 ratones, se les administró una dosis de MMS o EMS y posteriormente se analizó la frecuencia de ICH a dos periodos: uno temprano (TEM) y otro tardío (TAR). La persistencia en la inducción de ICH se evaluó comparando los incrementos en la frecuencia que se produjeron en ambos periodos. Los incrementos se obtuvieron a partir de la frecuencia de testigos paralelos no expuestos a estos agentes. Para distinguir los ICH se utilizó el método de incorporación al ADN de bromodesoxiuridina (BrdU) adsorbida a carbón activado [11] y la técnica de tinción diferencial de fluorescencia más Giemsa modificada [12].

3.2. Protocolo Experimental.

Las dosis de MMS y EMS fueron de 30 y 200 mg/Kg de peso, respectivamente. El período TEM correspondió a dos CDC posteriores al tratamiento y el TAR a ocho. Los tiempos (h) de estos periodos así como el de la administración de BrdU y el del sacrificio (figura 1) se establecieron en base al tiempo de generación promedio de la médula ósea que es de 12 h [13]. Para bloquear las células en metafase se les administró colchicina a los ratones, dos horas antes del sacrificio y la cosecha de las células se realizó mediante una técnica estándar.

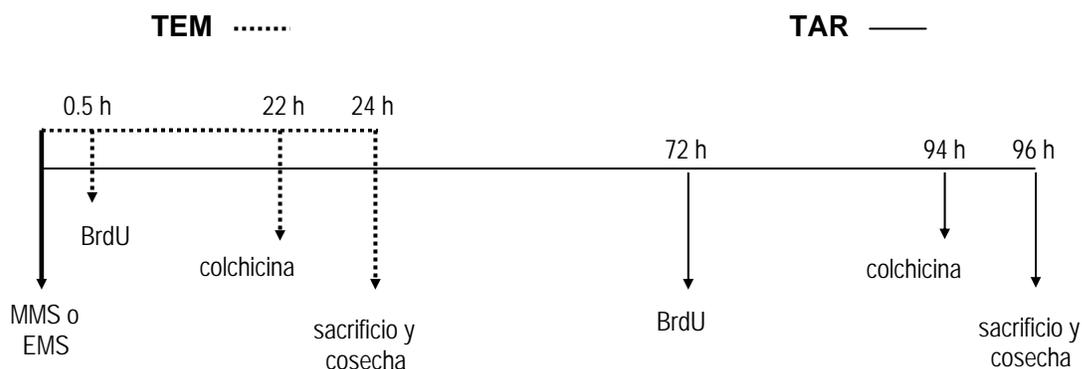


Figura 1 Protocolo experimental

3.3. Análisis.

En un microscopio óptico de campo claro se examinó el número de ICH's en cada una de 30 metafases por ratón y con estos registros se obtuvo el promedio de ICH/Célula y desviación estándar (D.E.), individual y por grupo. Se aplicó la prueba estadística de *t* de *Student* para evaluar las diferencias entre los grupos tratados y los grupos testigo.

4. RESULTADOS

4.1. Inducción de ICH y su Persistencia.

En la tabla inferior se muestra la frecuencia de ICH /Célula obtenida en cada uno de los períodos TEM y TAR, así como los incrementos de la misma con respecto a los valores de los testigos paralelos después de la exposición a los AA MMS y EMS. Los incrementos que causaron ambos AA en el período TEM fueron equivalentes a más del doble de la frecuencia basal respectiva (testigos), lo cual indica que tanto el MMS como el EMS a las dosis usadas fueron buenos inductores de ICH.

En el período TAR los incrementos fueron pequeños, equivalentes a 6 y 15% de los obtenidos en el período TEM después del tratamiento con MMS y EMS, respectivamente; y aunque ambos son pequeños, el causado por EMS sí es estadísticamente significativo. Esto podría indicar que la inducción de ICH por MMS no es persistente pero sí el 15% de la que produce el EMS.

Inducción de ICH y su persistencia causadas por agentes alquilantes

Tratamiento	ICH/Cél. + D.E.	Incremento	n
Testigo 1	4.2 ± 0.6		5
MMS TEM	12.2 ± 2.7	8.0*	5
MMS TAR	4.7 ± 0.6	0.5	5
Testigo 2	3.7 ± 0.1		4
EMS TEM	8.2 ± 1.3	4.5*	4
EMS TAR	4.4 ± 0.4	0.7*	5

n = número de ratones analizados, * los incrementos con respecto al testigo correspondiente fueron significativos con $P < 0.02$

Además, se realizó el análisis de la inducción de ICH y su persistencia a nivel de población celular en términos de frecuencia acumulada por número de ICH, considerando el total de células de cada grupo. En la figura 2 se puede observar el comportamiento de las diferentes poblaciones después del tratamiento con MMS (A) o con EMS (B), respecto a las poblaciones de los testigos paralelos. En el período TEM se observa que ambos mutágenos causan un claro desplazamiento de las curvas hacia valores altos de ICH; en cambio, en el período TAR el desplazamiento es mucho menor aunque el causado por EMS es más evidente. Estas observaciones están en concordancia con los resultados promedio por animal (tabla).

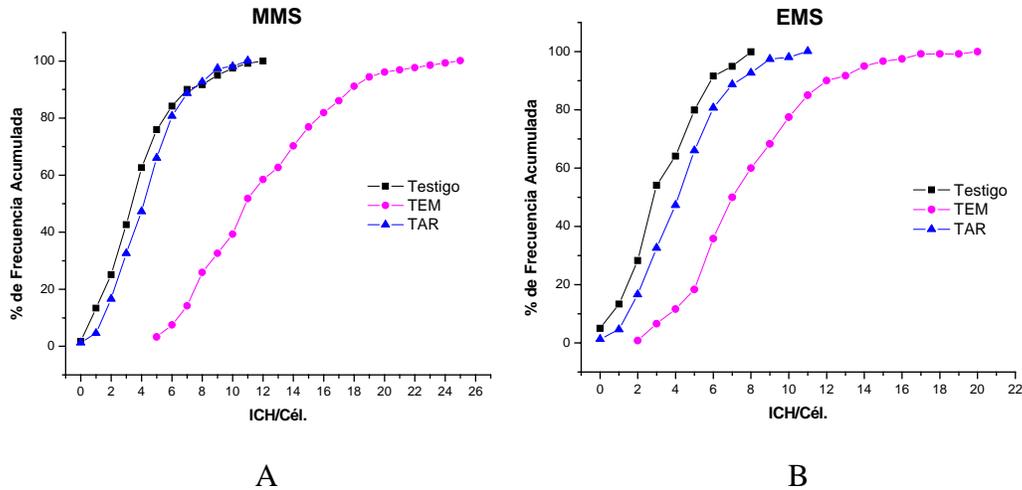


Figura 2. Frecuencia Acumulada de células (%) con respecto al número de ICH

5. DISCUSIÓN

5.1. Inducción de ICH.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron confirmar que los AA empleados son buenos inductores de ICH [4, 14, 15] ya que se observó que en el período TEM hubo un aumento en la frecuencia basal de 200 y 100% después del tratamiento con MMS y EMS, respectivamente.

5.2. Persistencia.

Resultados previos con 5-Azacitidina [16] y con radiación gamma [9] indicaron que un período de ocho CDC post-tratamiento es adecuado para evaluar persistencia total en la inducción de ICH. De acuerdo con esto, en el presente trabajo se esperaba que si la inducción causada por el MMS o el EMS fuera persistente, la frecuencia de ICH obtenida en ambos períodos post-tratamiento habría sido igual o muy similar; sin embargo, esto no se observó en ningún caso, aunque aproximadamente el 15% de la producida por EMS persistió hasta por ocho CDC. Esta pequeña proporción podría tener un origen epigenético, lo cual se comprobaría mediante el análisis de la inducción de ICH a través de varios CDC, desde dos hasta más de ocho.

Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de que esta pequeña inducción tardía se deba a la presencia de lesiones muy persistentes, como los alquilfosfotriésteres formados por la unión de grupos alquilo a los enlaces fosfodiéster del ADN [17] y no a un cambio epigenético.

Esta posibilidad es razonable si se considera que el EMS produce este tipo de lesiones en una proporción que va del 12 al 20% del total de sitios alquilados del ADN, mientras que el MMS no produce estos aductos [1, 2] y la inducción tardía de ICH observada no fue significativa. Una evidencia que apoya esta posibilidad, es que la ENU causa una inducción de ICH constante hasta por cinco CDC [8], lo cual coincide con el hecho de que el 80% de la alquilación que produce ocurre en los grupos fosfodiéster del ADN [1].

Un protocolo experimental que evalúe niveles de alquilfostotriésteres [17] e ICH en CDC subsecuentes al tratamiento con estos AA permitiría descartar la posibilidad de una asociación entre la inducción de ICH y la presencia de lesiones muy persistentes en el ADN.

Finalmente, en relación a la interrogante acerca del mecanismo por el cual, un cambio epigenético puede dar lugar a un proceso de recombinación constante por varios CDC, los resultados de este trabajo no permiten proponer una explicación, debido a que los agentes probados no causaron una inducción de ICH que se pudiera relacionar con un cambio epigenético.

6. CONCLUSIONES

- ❖ La inducción de ICH causada por el agente alquilante MMS aparentemente no esta asociada a un cambio epigenético.
- ❖ La pequeña proporción de inducción tardía de ICH causada por EMS podría estar asociada a un cambio epigenético o a la presencia de lesiones muy persistentes.

7. AGRADECIMIENTOS

Al ININ, a los técnicos Sr. Ángel Reyes P. y Sr. Perfecto Aguilar V., al M. en C. David Alcántara Díaz por la revisión del manuscrito.

8. REFERENCIAS

1. Vogel, E. W., "Genotoxic Chemicals: "An introduction in to basic principles of Genetic Toxicology". *Manual del Curso Internacional de genética toxicológica, molecular y aplicada, Facultad de Ciencias UNAM*, p. 2-3 (1991)
2. Beranek, D. T., "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents", *Mutat Res*, **231**, p. 11-30 (1990)
3. Perry, P., Evans, H. J "Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange", *Nature*, **258**, p. 121-125 (1975)
4. Engelward, B.P., Allan, J. D., Dreslin, A. J., Kelly, J. D. Wu, M. M., Gold, B. y Samson, L. D., "A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome", *J Biol Chem*, **273**, p. 5412-5418 (1998)
5. Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. and Takeda, S., "Sister chromatid exchange are mediated by homologous recombination in vertebrate cells", *Mol Cell Biol*, **19**, p. 5166-5169 (1999)
6. Yamashita, Y. M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Zhao, G. Y., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M. y Takeda, S., "RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells", *EMBO J*, **21**, p. 5558-5566 (2002)

7. Perticone, P., Palitti, F., Cozzi, R., D' Erme, M. y Bona, R., , "Persistence of azacitidine-induced SCE and genomic methylation in CHO cell in vitro", *Mut Res*, **245**, p. 211-215 (1990)
8. Rodríguez, R. R. and Morales, R. P., "Sister chromatid exchange induction and the course of duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU", *Mutagenesis*, **18**, p. 65-72 (2003)
9. Morales, R. P., Vallarino, K. T. Rodríguez R. R., "In vivo persistence of sister chromatid exchange (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow cells" *Environ Mutagen*, **6**, p.529-537 (1984)
10. Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. and Perticone, P., "DNA strand methylation and sister chromatid exchange in cells in vitro", *Mutat Res*, **429**, p. 239-248 (1999).
11. Morales, R. P., "Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells", *Mutat Res*, **74**, p. 61-69. (1980)
12. Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H. and Sugiyama, T., "Simple differential staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanisms of staining", *Chromosoma*, **53**, p. 223-230 (1975).
13. Ivett, J.L. and Tice, R. R., "Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics", *Environ Mutagen*, **4**, p. 358 (1982)
14. Kaina, B y Aurich, O, "Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time", *Mutat Res*, **149**, p. 451-461. (1985)
15. Morales, R. P., Rodríguez R. R., Vallarino, K. T, "Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents in vivo" *Mutat Res*, **344**, p.13-26 (1995)
16. Olvera, N. C., "Estudio in vivo de la inducción epigenética de intercambios en las cromátidas hermanas por 5-azacitidina", *Tesis de Licenciatura QFB*, Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, México (2005)
17. Le Pla, R. C. Guichard, Y., Bowman, K. J., Gaskell, M., Farmer, P. B. y Jones, G. D., , "Further development of 32-P postlabeling for detection of alkylphosphotriesters: evidence for the long- term nonrandom persistence of ethyl-phosphotriester adducts in vivo", *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, p. 1491-5000 (2004)